

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2650159号

(45) 発行日 平成9年(1997)9月3日

(24) 登録日 平成9年(1997)5月16日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A

請求項の数33(全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平1-14934

(22) 出願日 平成1年(1989)1月24日

(65) 公開番号 特開平2-5864

(43) 公開日 平成2年(1990)1月10日

(31) 優先権主張番号 5 5 9, 7 0 9

(32) 優先日 1988年2月24日

(33) 優先権主張国 カナダ (C A)

(31) 優先権主張番号 2 1 1, 3 8 4

(32) 優先日 1988年7月24日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 999999999

アクソ・ノベル・エヌ・ベー

オランダ国、6824・ベー・エム・アーネ
ム、フエルベルウエヒ・78

(72) 発明者 ローレンス・テイー・マレク

カナダ国、エル・6・ブイ・4・エイ・
5、オンタリオ、ブランプトン、スブラ
ウル・ドライブ・4

(72) 発明者 チエリル・ダベイ

カナダ国、エム・4・エヌ・1・エム・
4、オンタリオ、トロント、デインニツ
ク・クレセント・175

(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

審査官 平田 和男

(54) 【発明の名称】 核酸増幅方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試薬を順次添加することなく比較的に一定した温度で特定の核酸配列を増幅するための方法であって、

(A) (i) 第1のオリゴヌクレオチドプライマー、

(ii) RNAポリメラーゼプロモーターのアンチセンス配列を含む第2のオリゴヌクレオチドプライマー、

(iii) 前記プロモーターを認識するDNA依存性RNAポリメラーゼ、

(iv) RAN依存性DNAポリメラーゼ、

(v) DNA依存性DNAポリメラーゼ、

(vi) 一重鎖または二重鎖のRNAまたはDNAを加水分解することなくRNA-DNAハイブリッドのRNAを加水分解するリボヌクレアーゼ、および

(vii) リボヌクレオキシドトリホスフェートおよびデ

2

オキシリボヌクレオシドトリホスフェート

を含む単一の反応媒質を用意し、

(B) 前記特定核酸配列またはこの特定核酸配列と相補的な配列を含むRNA第一鋳型からなるRNAを、増幅反応サイクルが生起するような条件下で、前記反応媒質中に提供し、しかる後、

(C) 前記特定核酸配列の所望の増幅を達成するのに十分な時間前記条件を維持するステップからなる方法。

【請求項2】 前記RNA第一鋳型が前記特定核酸配列を含んでおり、ステップ(B)が前記反応溶媒質中に一重鎖RNAを提供することを含んでおり、その結果、

(i) 前記第1のオリゴヌクレオチドプライマーが前記一重鎖RNDとハイブリダイズし、

(ii) 前記RNA依存性DNAポリメラーゼが前記一重鎖RNAを鋳型として利用して前記第1オリゴヌクレオチドプラ

イマーを伸長することによってDNA第二鋳型を合成し、それによりRNA-DNAハイブリッドを形成し、
 (iii) 前記リボヌクレアーゼが、前記RND-DNAハイブリッドを構成しているRNAを加水分解し、
 (iv) 前記第2オリゴヌクレオチドプライマーが前記DNA第二鋳型とハイブリダイズし、
 (v) 前記DNA依存性DNAポリメラーゼが前記第2オリゴヌクレオチドプライマーを鋳型として利用して前記DNA第二鋳型を伸長することによって機能性のRNAポリメラーゼプロモーターを合成し、
 (vi) 前記DNA依存性RNAポリメラーゼが前記機能性プロモーターを認識し、かつ前記DNA第二鋳型を転写し、それにより前記RNA第一鋳型のコピーを生成させることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 【請求項3】前記第2オリゴヌクレオチドプライマーがさらに前記DNA依存性RNAポリメラーゼに対する転写開始部位のアンチセンス配列を含んでおり、前記転写開始部位の前記アンチセンス配列が前記RNAポリメラーゼプロモーターの前記アンチセンス配列と機能可能のように結合していることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 【請求項4】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼであり、転写開始部位の前記アンチセンス配列及び機能性RNAポリメラーゼプロモーターの前記アンチセンス配列が一緒になって次のヌクレオチド配列
 AATTCTAATACGACTCATATAGCGAG
 を構成することを特徴とする請求項1に記載の方法。
 【請求項5】ステップ(B)がさらに前記反応媒質にサンプルを添加することを含んでおり、その際の条件は、前記特定核酸配列またはこの特定核酸配列と相補的な配列を含むRNA第一鋳型からなるRNAが前記サンプルによって提供された場合に前記サイクルが生起するような条件とすること、および、ステップ(C)の後にさらに前記試薬(i)、(ii)および(vii)のいずれかの消費または前記サイクルの産物の蓄積に関して前記反応媒質をモニターするステップ(D)を含んでいることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 【請求項6】ステップ(D)が前記サイクルの核酸産物を検出することを含む請求項4に記載の方法
 【請求項7】ステップ(D)が核酸プローブを使用して前記核酸産物を検出することを含む請求項5に記載の方法。
 【請求項8】ステップ(D)が制限エンドヌクレアーゼと電気泳動分離を使用して前記核酸産物を検出することを含む請求項5に記載の方法。
 【請求項9】ステップ(D)が前記RNA第一鋳型の蓄積をモニターすることを含む請求項5に記載の方法。
 【請求項10】ステップ(D)が前記DNA第二鋳型の蓄積をモニターすることを含む請求項5に記載の方法。
 【請求項11】ステップ(D)が機能性のRNAポリメ

ラーゼプロモーターを含有するDNAをモニターすることを含む請求項5に記載の方法。
 【請求項12】ステップ(D)が前記RNA-DNAハイブリッド中間体の蓄積をモニターすることを含む請求項5に記載の方法。
 【請求項13】ステップ(D)がさらに、前記試薬(i)、(ii)および(vii)のいずれかの消費または前記サイクルの産物の蓄積を、前記特定核酸配列およびそれと相補的な前記配列が存在しない場合の前記反応媒質中における前記試薬の消費または前記産物の蓄積に相当する値と比較することを含む、請求項5に記載の方法。
 【請求項14】前記リボヌクレアーゼが大腸菌リボヌクレアーゼHおよびトリ骨髄芽球症ウィルスポリメラーゼのリボヌクレアーゼHからなることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 【請求項15】前記リボヌクレアーゼが子ウシ胸腺リボヌクレアーゼHであることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 【請求項16】前記第1オリゴヌクレオチドプライマーまたは前記第2オリゴヌクレオチドプライマーが、固定化された支持体と可逆的に結合する、請求項1に記載の方法。
 【請求項17】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージRNAポリメラーゼである請求項1に記載の方法。
 【請求項18】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージT7RNAポリメラーゼである請求項16に記載の方法。
 【請求項19】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージT3ポリメラーゼである請求項16に記載の方法。
 【請求項20】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがバクテリオファージφ IIポリメラーゼである請求項16に記載の方法。
 【請求項21】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがサルモネラバクテリオファージsp6ポリメラーゼであることを特徴とする請求項16に記載の方法。
 【請求項22】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがPseudomonasバクテリオファージqh-1ポリメラーゼであることを特徴とする請求項16に記載の方法。
 【請求項23】前記RNA依存性DNAポリメラーゼがレトロウイルスリバーシトランスクリプターゼであることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 【請求項24】前記レトロウイルスリバーシトランスクリプターゼがトリ骨髄芽球症ウィルスポリメラーゼであることを特徴とする請求項22に記載の方法。
 【請求項25】前記レトロウイルスリバーシトランスクリプターゼがモロニー(Moloney)マウス白血病ウィルスポリメラーゼであることを特徴とする請求項22に記載

の方法。

【請求項26】前記DNA依存性RNAポリメラーゼがエキソヌクレアーゼ活性をもたないことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項27】前記反応媒質中のDNAポリメラーゼがいずれもDNAエキソヌクレアーゼ活性もDNAエンドヌクレアーゼ活性ももたない、請求項1に記載の方法。

【請求項28】前記DNA依存性DNAポリメラーゼがトリ骨髄芽球症ウイルスポリメラーゼである請求項1に記載の方法。

【請求項29】前記DNA依存性DNAポリメラーゼがDNAポリメラーゼ α またはDNAポリメラーゼ β である請求項1に記載の方法。

【請求項30】前記DNA依存性DNAポリメラーゼが子ウシ胸腺DNAポリメラーゼである請求項1に記載の方法。

【請求項31】ステップ(C)が前記条件を30分～4時間維持することからなる、請求項1に記載の方法。

【請求項32】さらに、前記サイクルのDNA産物をクローニングベクターに結合した後前記DNA産物をクローン化するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項33】さらに、前記サイクルの前記DNA産物がコードしている産物を発現系で発現させるステップを含む、請求項31に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、特定核酸配列の増幅方法に係る。

発明の背景

標本中に存在する特定の核酸配列を検出するために核酸の相補的配列で標本をプローブすることは公知の診断方法で使用されている。核酸と相補的核酸との結合は高度に特異的であり、従って標本中に特定の核酸が存在するか否かを有効に判定し得る。このためには、検出すべき特定核酸配列が既知であり該特定配列に相補的な核酸配列をもつプローブを構築することが必要である。

本願において、「特定核酸配列」なる用語は、増幅させるべき一重鎖または二重鎖の核酸を意味する。「標本」なる用語は、複数の核酸を含有する混合物を意味する。「十分に相補的な」なる用語は、2つの核酸即ちプライマーと鋳型とが特異的に相互作用でき所与のイオン強度条件及び温度条件下にプライマー依存性で鋳型依存性のDNA合成を有効に行なうことを意味する。

核酸プローブは高度に特異的であるため、いくつかの場合には、核酸配列によって産生されるタンパク質よりもむしろ核酸配列自体をプローブするほうが好ましい。例えば、タンパク質検出だけにに基づく診断方法では、B型肝炎ウイルスの感染性粒子の存在に関して信頼できる診断を下すことができない。その理由は、DNAゲノムの欠失した非感染性抗原粒子が有意レベルで存在するからである。別の例では、前癌性または良性の子宮頸部腫瘍中に検出されるヒト乳頭腫ウイルスの種々のサブタイプ

は核酸プローブハイブリダイゼーションを使用したときにのみ識別できる。またエイズの微生物学的研究からも、エイズ特異的核酸配列の存在に基づくアッセイが最良の診断方法であることが確認された。

既存の核酸プローブ技術の使用に伴う最大の困難及び既存のプローブ技術の実用性に限界がある理由は、コピー数の問題にある。例えば、1つのウイルスまたは細胞中に通常は特定遺伝子の単一コピー(single copy)が存在する。この1つのコピーがRNAまたはタンパク質のごとき遺伝子産物のコピーを多数生成し得る。このため、検出すべき核酸の特定配列がタンパク質の数千ものコピーを生じ得るので、診断方法においてはタンパク質をプローブする技術がしばしば使用されてきた。

レジオネラ(Leigioneila)及びマイコプラズマ(Mycoplasma)のごときある種の細菌性病原体の診断を核酸プローブを用いて容易に行なうために、細胞当たり100,000コピーにのぼる多数の天然リボソームRNAが遺伝子プローブ(GenProbe)法によって使用されてきた。しかしながら、この戦略は、ウイルスのごとき非細胞性病原体には使用できない。核酸プローブを用いたエイズウイルス検出方法の開発ではコピー数が特に問題になる。何故ならこの場合、組み込まれたブロウイルスは10,000個の末梢血リンパ球のうち1個未満のリンパ球中に存在し得るからである。従って、標本中に存在すると予想される特定核酸配列を増幅できれば、コピー数の問題が解決されプローブアッセイをより容易に使用できる。

少数の細胞しか含まず従って特定遺伝子の少数コピーしか含まない正常生物標本においては、コピー数の問題を解決するために増幅方法を利用する必要がある。

1つの増幅方法は、標本の「十分な増殖」を行なうこと、即ち標本中に存在する生きた生物物質が自然に複製できるように条件を整えることである。核酸配列の量を複製によって検出可能レベルまで増加させる。例えば食品産業では、加工食品の有害細菌Salmonellaを検査するために、食品標本を何日間もインキュベートして核酸量を増加させる必要がある。臨床標本では、病原体の数を増加させるために標本をかなりの期間にわたって増殖させる必要がある。

1987年7月28日付けCetus Corporationの米国特許第4,683,195号及び1987年7月28日付けのCetus Corporationの米国特許第4,683,202号は夫々、標本中に含まれる標的核酸配列の増幅方法を開示している。米国特許第4,683,195号に記載された方法は、標的核酸配列を含有すると予想される標本をオリゴヌクレオチドプライマーで処理してプライマー伸長産物を合成し、該産物を鋳型として標的核酸配列を増幅させる方法である。好適実施例では熱変性を用いてプライマー伸長産物を鋳型から分離している。また、米国特許第4,683,202号に記載の方法は、異なる2つの相補鎖をもつ標的核酸配列の増幅方法である。この方法では、鎖をプライマーで処理

して伸長産物を合成し、プライマー伸長産物を鋳型から分離し、次にプライマー伸長産物を鋳型として使用する。

前出の2つの米国特許はいずれも、増幅方法においてユーザーが手動的または機械的に介入しかつ多段階操作を行なう必要がある。これらの特許に含まれる操作段階では、ユーザーが標本を加熱し、冷却し、適当な酵素を添加し、次いで諸段階を繰り返す必要がある。温度変化は酵素を失活させる。従ってユーザーは増幅過程の際に適当な酵素のアリコートを増幅混合物に繰り返し補充する必要がある。

米国特許第4,683,195号及び第4,683,202号によれば更に、増幅方法の各サイクルでは第1鋳型から第2鋳型が合成され、次に第2鋳型を用いて第1鋳型が合成される。このようにしてこの手順が繰り返されるが、増幅方法の各サイクルは1つの基質から1つの産物の合成に基づいている。

従来技術に開示された増幅方法にかかわらず、増幅方法の改良が必要とされている。ユーザーの介入が少なく操作が少ない増幅方法が好ましい。更に、増幅方法に関与する酵素の活性に影響を与えないように増幅が比較的一定の室温で行なわれるのが有利である。増幅方法の各サイクル毎に1つの鋳型を使用して1つの基質から2つ以上の産物を生成することができれば更に好都合であろう。

発明の概要

本発明は、ユーザーによる介入及び操作が従来の増幅方法よりも少ない有利な増幅方法に係る。増幅が比較的一定の室温で行なわれる。更に、この方法の各サイクルでは1つの基質からその産物の複数コピーが産生される。本発明の増幅方法は、特定核酸の量を増加させることによりコピー数の問題を解決するために使用され得る。従って、ブローブアッセイの使用がより容易になる。また、特定核酸配列の純度を向上させるために本発明の増幅方法を従来のクローニング方法に代替して使用することも可能である。

本発明の1つの態様に従って特定核酸配列の増幅方法が使用される。この方法は、一重鎖RNA、一重鎖DNA及び二重鎖DNAの合成を含む。一重鎖RNAは第1プライマー用第1鋳型である。一重鎖DNAは第2プライマー用第2鋳型である。二重鎖DNAは第1鋳型の複数コピー合成用第3鋳型である。第1または第2のプライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的であり、第1または第2のプライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相同である。第1プライマーの3'の末端は相補鎖上の第2プライマーの3'の末端に向けて方向付けされている。

本発明の別の態様に従って特定核酸配列の増幅方法が使用される。この方法は以下の段階を含む。

(a) 第1プライマーを第1鋳型にハイブリダイズす

る。第1プライマーは第1鋳型のRNA配列に十分に相補的なDNA配列をもつ。

(b) 第1プライマーに共有結合し第1鋳型のRNA配列に相補的な第1DNAを合成する。第1DNA配列及び第1プライマーが第2鋳型を構成する。

(c) 第2プライマーのハイブリダイゼーションを行なわせるために第1鋳型を第2鋳型から分離する。

(d) 第2プライマーを第2鋳型にハイブリダイズする。第2プライマーは第2鋳型のDNA配列に十分に相補的なDNA配列をもつ。第2プライマーはまたRNAポリメラーゼ用のプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列とをもつ。

(e) 第2プライマーに共有結合し第2鋳型のDNA配列に相補的な第2DNA配列を合成し、第2鋳型に共有結合し第2プライマーのDNA配列に相補的な第3DNA配列を合成する。第2及び第3のDNA配列及び第2プライマー第2鋳型が第3鋳型を構成する。

(f) 第3鋳型から第1鋳型のRNA配列の複数コピーを合成する。

第1または第2のプライマーの配列は特定核酸配列に十分に相補的であり、第1または第2のプライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相同である。第1プライマーの3'末端は相補鎖上の第2プライマーの3'末端に向かって方向付けされている。

本発明の別の方法では、第2プライマーDNAが第2鋳型のDNA配列に十分に相補的な配列を3'末端にもつ。第2プライマーは5'末端にRNAポリメラーゼ用のプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列とをもつ。

本発明の更に別の方法では、第2鋳型に共有結合した第3DNA配列は第2プライマーの5'末端のDNA配列に相補的である。

本発明の別の方法においても特定核酸配列の増幅方法が使用される。該方法では、第1プライマーと第2プライマーとリボヌクレアーゼHとRNA依存性DNAポリメラーゼとDNA依存性DNAポリメラーゼとRNAポリメラーゼとリボヌクレオシド三リン酸とデオキシリボヌクレオシド三リン酸とを標本と混合する。第1プライマーDNAは第1鋳型RNAに十分な相補的な配列をもつ。第2プライマーDNAは、RNAポリメラーゼによって基質として認識される第2鋳型DNAに十分に相補的な配列とプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列とをもつ。第1プライマーまたは第2プライマーの配列は、特定核酸配列の配列に十分に相補的であり、第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相同である。第1プライマーの3'末端は相補鎖上の第2プライマーの3'末端に向かって方向付けされている。

本発明の更に別の方法においても特定核酸配列の増幅方法が使用される。この方法では、第1プライマーと第

2プライマーとトリ筋芽細胞腫ウイルスポリメラーゼと大腸菌リボヌクレアーゼHとバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼとリボヌクレオシド三リン酸とデオキシリボヌクレオシド三リン酸とを標本に添加する。第1プライマーDNAは第1 鋳型RNAに十分に相補的な配列をもつ。第2プライマーDNAはT7 RNAポリメラーゼによって基質として認識される第2 鋳型DNAに十分に相補的な配列とプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列とを含む。第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的であり、第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分な相同である。第1プライマーの3'末端は相補鎖上の第2プライマーの3'末端に向かって方向付けされている。

具体例

本発明は特定核酸配列の増幅方法に係る。増幅はDNA及びRNAの交互合成を含み第1図に概略的に示されている。この方法においては、一重鎖RNAが一重鎖DNAに変換され、該一重鎖DNAが出発一重鎖RNAの複数コピー合成用の機能性鋳型に変換される。第1プライマー及び第2プライマーが増幅方法で使用される。第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相補的であり、第1プライマーまたは第2プライマーの配列は特定核酸配列の配列に十分に相同である。いくつかの場合、例えば特定核酸配列が二重鎖DNAの場合には、第1プライマーと第2プライマーとの双方が特定核酸配列の配列に十分に相補的で且つ十分に相同である。

RNAオリゴヌクレオチドプライマー（第1プライマー）をRNA（第1 鋳型）にハイブリダイズさせRNA依存性DNAポリメラーゼを用いて第1プライマーから相補鎖DNA（第1DNA配列）を合成することによって一重鎖DNAに変換される。例えば第1 鋳型の加水分解とRNA-DNAハイブリッドに特異的なリボヌクレアーゼ（例えばリボヌクレアーゼH）を使用し、得られた一重鎖DNA（第2 鋳型）を第1 鋳型から分離する。第2 鋳型はRNA合成可能な形態に変換される。この変換は、第2 鋳型の3'末端に十分に相補的な配列を3'末端に含み5'末端に向かってプロモーターのアンチセンス鎖と転写開始部位のアンチセンス配列とを含む配列をもつ合成オリゴヌクレオチド（第2プライマー）をハイブリダイズし、第2 鋳型を鋳型として用いて第2プライマーの3'末端に共有結合した第2DNA配列を合成し、DNA依存性DNAポリメラーゼを用い第2プライマーを鋳型として用いて第2 鋳型の3'末端に共有結合した第3DNA配列を合成することによって行なわれる。得られた第2 鋳型の機能性誘導体が第3 鋳型であり、これを使用し、第2プライマーによって規定されるプロモーター及び転写開始部位に特異的なRNAポリメラーゼを用いて第1 鋳型であるRNAの複数コピーを合成する。サイクルを繰り返すことによって、新しく合成された第1 鋳型の各々が更に第2 鋳型及び第3 鋳型のコ

ピーに変換され得る。また、サイクルの繰り返しがユーザーの介入または操作を不要とする。

増幅方法は、適当な反応条件下に適当な酵素、プライマー及び補因子に適当な鋳型核酸を添加することによって開始される。この鋳型核酸は、均質で連続的な増幅が可能な形態であり、第1図に示すサイクルにおける中間体として機能する。増幅方法では前駆体（プライマー、リボヌクレオシド三リン酸及びデオキシリボヌクレオシド三リン酸）の正味（net）の消費及び産生物（RNA及びDNA）の正味の蓄積が生じる。RNA及びDNAの合成過程は、検出に十分なレベルの核酸が合成されるまで非同時的に進行する。増幅過程は例えば標識前駆体からの標識産生物の合成によって追跡され得る。

増幅が、第1図に概略的に示すプロセスに付加または代替して別のプロセスを含んでもよい。また、ある種の逆産生性（counter productive）酵素反応が許容できる低速度で発生してもよい。予想される非産生性副反応の1つは、鋳型核酸の非存在下のRNA及び／またはDNAの合成である。かかるRNA及び／またはDNA産物を所望産生物から識別するためには、特定核酸配列の2つのプライミング部位間のみ検出される特定配列の有無を判定すればよい。

第1プライマーは、第1 鋳型の3'末端に十分に相補的配列を3'末端にもつオリゴデオキシリボヌクレオチドである。第1プライマーの3'末端の配列は、所与のイオン強度条件及び温度条件下に第1DNA配列を特異的効率的に合成するために十分な特定の長さ及び塩基組成をもつ。第1サイクルにおいて第1プライマーは第1 鋳型の3'末端の内部の領域に十分に相補的であり得る。その後のサイクルにおいて、第1プライマーの5'末端は第1 鋳型の3'末端に相補的であろう。第1プライマーの一部または全部が天然デオキシリボヌクレオチド以外のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体から構成されてもよいと考えられる。第1サイクルで第1プライマーの5'末端は第1 鋳型に相補的でない配列を含んでもよい。非相補的配列は、固定化可能な核酸に相補的であってもよく、または検出容易なリポーターのごとき有用な非核酸成分と結合可能であってもよい。または、非相補的配列が、プロモーターのアンチセンス配列とRNA合成に使用できる転写開始部位のアンチセンス配列とを含んでもよい。このRNAは、第1 鋳型に相補的であり別の増幅サイクルで中間体として使用され得る。

第2プライマーは第2 鋳型の3'末端に十分に相補的配列を3'末端に含むオリゴデオキシリボヌクレオチドである。第2プライマーは所与のイオン強度条件及び温度条件下に第2及び第3のDNA配列を特異的効率的に合成せしめるに十分な特定の長さ及び塩基組成をもつ。更に、第2プライマーは機能性プロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列とを含む。この配列は、第3DNA配列の合成用鋳型として使用された

とき、RNAポリメラーゼの特異的効率的結合と所望部位での転写開始と行なわせるに十分な情報を含む。プロモーター配列は機能性プロモーターのアンチセンス鎖に由来してもよい。転写開始部位は天然RNA転写物の5'末端配列に由来してもよい。好適実施態様においては、第2プライマーの5'末端配列は、AATTCTAATACGACTCACTATAGCGAGである。この配列は、T7 RNAポリメラーゼ用のプロモーターのアンチセンス配列と転写開始部位のアンチセンス配列とを含む。または、別のファージRNAポリメラーゼ用の転写開始部位とプロモーターとを使用して

もよい。更に、プロモーター機能に関係しない配列が、第2プライマーの5'末端に含まれるかまたは第2鋳型にハイブリダイズする3'末端の配列と転写開始部位との間に含まれていてもよい。第2プライマーの一部または全部が天然デオキシリボヌクレオチド以外のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体から構成されてもよい。本発明で使用される酵素はすべて、いくつかの実用規格を充足させる必要がある。酵素または酵素調製物の各々は、ある種のDNAポリメラーゼ及び一重鎖または二重鎖に特異的なエキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼにおいてしばしばみられる5'-または3'-のエキソヌクレアーゼ活性のような有害なデオキシリボヌクレアーゼ（「DNase」）活性を有してはならない。酵素または酵素調製物の各々は、RNA及びDNAのハイブリッドに特異的で好適なリボヌクレアーゼ活性（例えばリボヌクレアーゼH）の添加を除いて、有害なリボヌクレアーゼ（「RNase」）活性を有してはならない。更に各酵素は、その他の酵素過程、及びRNAまたはDNA鋳型にオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズするような非酵素過程で使用される一般的な反応条件下で適当な程度に活性でなければならない。

本発明で使用されるDNA依存性RNAポリメラーゼは、プロモーターと指称される特定DNA配列に結合できかつプロモーターに極めて近接した所定の開始部位でRNAのin vitro合成を特異的に開始し得るいかなる酵素でもよい。プロモーター及び開始部位が第2プライマーの一部を形成する。更に、RNAポリメラーゼは、適当な時間内に鋳型の機能性コピー当たり数個のRNAコピーを合成し得ることが必要である。好適実施態様では、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼが使用される。更に別の、バクテリオファージRNAポリメラーゼ、例えばファージT3、ファージφ II、Salmonellaファージsp6またはPseudomonasファージφh-1の使用も可能である。また別の実施態様では、原核細胞または真核細胞DNA依存性RNAポリメラーゼを使用してもよい。別のRNAポリメラーゼを使用する場合には、第2プライマーのプロモーターを配列及び開始配列を特定RNAポリメラーゼの鋳型特異性に従って適宜変更する必要がある。

本発明で使用されるRNA依存性DNA依存性DNAポリメラーゼはオリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー及びRN

A鋳型からDNAを合成し得るいかなる酵素でもよい。この酵素は更に、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性及びRNase H活性を含んでいてもよい。好適実施態様においては、トリ筋芽細胞ウイルスポリメラーゼ（「AMV逆転写酵素」）が使用される。更に、RNA依存性DNAポリメラーゼが別のレトロウイルス、例えばモロニー（Maloney）マウス白血病ウイルスに由来してもよい。または別の真核細胞RNA依存性DNAポリメラーゼを使用してもよい。

本発明で使用されるDNAポリメラーゼは、オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーとDNA鋳型とからDNAを合成し得るいかなる酵素でもよい。この酵素は多くの種類のDNAポリメラーゼに関連する5'-または3'-エキソヌクレアーゼ活性を有してはならない。好適実施態様ではAMV逆転写酵素が使用されるが、5'-または3'-のエキソヌクレアーゼ活性が本来欠如したDNA依存性DNAポリメラーゼも使用できる。このようなポリメラーゼの例は、いくつかの真核細胞DNAポリメラーゼ、例えばDNAポリメラーゼαまたはβ、子ウシ胸腺のごとき哺乳類組織から単離されるDNAポリメラーゼである。普通なら不適当なDNAポリメラーゼも、DNAポリメラーゼ遺伝子の変性と適当な宿主細胞中での変性ポリメラーゼの発現とを順次行なうかまたDNAポリメラーゼタンパク質を化学的に修飾することによって不要なエキソヌクレアーゼ活性を除去すれば有用になる。変性型のDNAポリメラーゼは、大腸菌ポリメラーゼIのクレノウ（Klenow）フラグメントから調製されてもよくまたはバクテリオファージT7 DNAポリメラーゼから調製されてもよい。好適実施態様においては、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性とDNA依存性DNAポリメラーゼ活性との両方が同じ酵素によって与えられるので、前記のごとき変性型のDNA依存性DNAポリメラーゼ活性は、RNA依存性DNAポリメラーゼに起因する活性の補足として付加されることが理解されよう。

本発明で使用され得るRNase Hは相補的DNAにアニールされるRNAを加水分解し得るいかなる酵素でもよい。この酵素は、一重鎖または二重鎖のRNAまたはいかなるDNAも加水分解してはならない。好適実施態様においては、大腸菌RNase Hを使用する。更に別のRNase H酵素、例えば子ウシ胸腺RNase Hの使用も可能である。RNase HはAMV逆転写酵素の固有活性であるから、好適実施態様では大腸菌RNase HとAMV逆転写酵素のRNase Hが付加される。また第1鋳型から第2鋳型を分離し得る別のいかなる酵素を使用してもよい。

DNA合成及びRNA合成の双方にとって必要な緩衝液及び補因子を入れた反応容器で前記酵素とプライマーとを一緒に混合する。更に当業者に公知のごとくDNA及びDNA鋳型にプライマーを特異的にハイブリダイズさせるための適当なイオン条件及び反応温度を与える。反応混合物は、増幅方法を妨害する物質、例えば酵素の活性を大幅に阻害するかプライマーと鋳型とのハイブリダイズを妨

害するかまたは核酸中間体及び産生物を非生産的に分解させる物質を含んでいてはならない。

増幅方法の応用に役立つと思われるいくつかの検出手順を説明する。本増幅方法で合成された核酸の検出手段が記憶の手順に限定されないこと、別の検出方法の使用が可能であることが理解されよう。

検出手順の1つの実施態様においては、反応混合物に標識前駆体を添加し得る。当業者に公知の方法を用いて標識前駆体から分離できる標識産生物の定量分析または定性分析によって増幅が検出される。

標識前駆体は、RNA合成を検出するリボヌクレオシド三リン酸でもよく、またDNA合成を検出するデオキシヌクレオシド三リン酸またはオリゴヌクレオチドプライマーでもよい。標識のタイプは放射性同位体でもよく、またはビオチンのごとき有用な化学基、発色団、蛍光発色団または抗体に結合し得るハプテンでもよく、またはタンパクまたは酵素でもよい。標識産生物は溶解度、電荷またはサイズに基づいて標識前駆体から分離されてもよい。更に、標識DNAまたはRNAを、相補配列を含み固定化することが可能な核酸にハイブリダイズしてもよい。

別の実施態様においては、増幅方法の産生物が固定化担体に結合され、相補配列を含む核酸プローブにハイブリダイズされ、さらに溶液中に残存する非ハイブリダイズ核酸プローブから分離され得る。産生物たるDNAまたはRNAは、疎水的、静電的または共有相互作用のような安定な相互作用によって固体担体に直接結合されてもよい。更に、産生物は、固定化タンパク質（例えばアビジンまたはストレプトアビジン）に結合させること増幅方法では、その産生物中に取り込まれ得るビオチンのようなある種の化学基を含んでもよい。更に産生物は、相補配列を含み固定化することが可能な核酸にハイブリダイズされてもよい。核酸プローブは、ハイブリダイゼーション条件下に結合を生じかつ非ハイブリダイズ核酸プローブの除去に使用される条件下で持続的に結合させるために増幅方法の産生物と十分に安定な相互作用を形成する相補配列を含む。好適実施態様において、相補配列は第1プライマー配列と第2プライマー配列との間に存在する特定核酸配列の配列部分に由来する。核酸プローブは、一重鎖DNAまたはRNAでもよく、または一重鎖にできる二重鎖DNAまたはRNAでもよく、またはデオキシリボヌクレオチド及び/またはリボヌクレオチドから構成され得るオリゴヌクレオチドでもよい。更に、核酸プローブは、適当な条件下にDNA産物またはRNA産物に共有結合し得る化学基を含んでいてもよい。放射性同位体、ビオチンのごとき有用な化学基、発色団、蛍光発色団または抗体に結合し得るハプテンで核酸プローブを標識してもよい。核酸プローブは更に、タンパク質またはホスファターゼ、ペルオキシダーゼのごとき酵素との複合体を形成し得る。核酸プローブは更にプローブをin vitro複製し得るある種の配列を含んでいてもよい。

分子クローニング技術によって進歩した典型的核酸処理方法によって本増幅方法の産生物を分析することが可能である。1つの方法では、合成DNAを制限エンドヌクレアーゼで分解し、電気泳動法で分離し、当業界で公知の方法で検出することによって特定DNA配列の合成を検出し得る。別の方法では、RNA依存性DNAポリメラーゼと第1プライマーとジデオキシヌクレオシド三リン酸とを用いたDNA合成によって、増幅RNAの配列を決定し得る（Stoflet等、1988）。更に別の方法では、本増幅方法で使用したDNA依存性RNAポリメラーゼと3'-デオキシリボヌクレオシド三リン酸とを用いたRNA合成によって増幅された第3鋳型の配列を決定し得る（Axelrod & Kramer, 1985）。別の方法においては増幅RNAがin vitro翻訳され得るポリペプチドをコードするであろう。in vitro翻訳されたポリペプチド産生物は抗体を用いて分析され得る。

特定核酸配列を合成すると予想されるかまたは含有することが判明している標本を、均質な連続増幅が可能な鋳型核酸の形態で反応混合物に添加する。この反応混合物は第1図のサイクル中のいかなる中間体でもよい。特に、鋳型核酸は、第2プライマーの3'末端に存在する配列と十分に相同の配列を5'末端に含み、かつ第1プライマーに十分に相補的な配列を含む一重鎖RNAでもよい。この形態の鋳型核酸は本増幅方法では第1鋳型として機能するであろう。または、中型核酸は、第2プライマーの少なくとも3'末端と十分に相補的な配列を3'末端に含みかつ第1プライマーの3'末端に存在する配列に十分に相互の配列を含む一重鎖DNAでもよい。この形態の鋳型核酸は本増幅方法では第2鋳型として機能するであろう。または鋳型核酸は、一方の鎖が5'末端に第2プライマーの完全配列を含みかつ第1プライマーと十分に相補的な配列を含む二重鎖DNAでもよい。二重鎖DNAは本増幅方法では第3鋳型として機能する。

鋳型核酸の調製は本増幅方法の一部を構成しないが、増幅方法の応用に役立つと思われる鋳型核酸形成手順の幾つかの例を以下に説明する。しかしながら鋳型核酸形成手順が記載の種々の手順に限定されることなく別の方法も使用できることは理解されよう。

鋳型核酸形成手順の1つの例においては、第1鋳型として機能し得る鋳型核酸は、天然由来RNAであるかまたは当業界で公知の部位特異的加水分解法（Shibahara等、1987）を用いてより大きいRNA分子から生成され得るRNAフラグメントであり得る。

別の例においては、第2鋳型として機能し得る鋳型核酸は、第2プライマーの3'末端に十分に相補的な配列に直接つながり（flanking）、制限エンドヌクレアーゼで消化し得る部位をもつ二重鎖DNAから調製され得る。

更に別の例においては、第2鋳型として機能し得る鋳型核酸は、DNA合成を阻止し得るオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた一重鎖DNAまたはRNAから調製され

る。この索子オリゴヌクレオチドは適当な条件下に鋳型に共有結合し得る化学基を含んでもよい。第1プライマーを使用してこの阻止された鋳型からDNAを合成すると第2鋳型と同じ3'末端をもつ合成DNAが得られる。出発鋳型がRNAのとき、得られるDNA-RNAハイブリッドは鋳型核酸として直接使用され得る。出発鋳型がDNAのとき、得られた第2鋳型のコピーは化学的または熱的変性方法によって出発鋳型から分離され得る。

別の例においては、第3鋳型として機能する鋳型核酸は、第2プライマーを用いてDNAまたはRNA鋳型からDNA合成された一重鎖DNAまたはRNAから調製される。得られた合成DNAを化学的または熱的変性方法を用いて出発鋳型から分離する。更に、化学的または酵素的方法を用いてRNA鋳型を加水分解する。得られた一重鎖DNAは5'末端に共有結合した第2プライマーの配列をもちかつ第1プライマーに十分に相補的配列を含む。一重鎖DNAに第1プライマーをハイブリダイズし、さらに第1プライマーに共有結合しかつ一重鎖DNAに相補的なDNA配列を合成することによって、この一重鎖DNAを転写機能をもつ二重鎖DNAに変換し得る。

さら別の例においては、化学的、熱的または任意に酵素的方法を用いて二重鎖DNA、二重鎖RNAまたはDNA-RNAハイブリッドから一重鎖DNAまたはRNA鋳型を得ることができる。次に、前述の鋳型核酸形成手順のいずれかを用い、得られた一重鎖DNAまたはRNAから第1、第2または第3の鋳型として機能する鋳型核酸を生成する。また、第1プライマー及び核酸の一方の鎖が関与する手順と第2プライマー及び核酸の他方の（相補）鎖が関与する別の手順とを同時に使用して鋳型核酸を調製することも可能である。

材料及び方法

材料

Applied Biosystems 380A DNAシンセサイザーを使用してオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチド合成に使用したカラム、ホスホラミジット（phosphoramidites）及び試薬はTechnical Marketing Associatesを介してApplied Biosystems, Inc.から入手した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動泳びDEAEセルロースロマトグラフィーを順次用いてオリゴヌクレオチドを精製した。放射性同位体 [α -³²P] UTP (800Ci/mmol) はAmershamから入手した。DNAを分離及び結合させる酵素はNew England Biolabsから購入した製造業者の使用説明書通りに使用した。DNAポリメラーゼ1 (Klenow) の大フラグメントを含む調製物もNew England Biolabsから購入した。RNasin及びT7 RNAポリメラーゼはBio/Can Scientific Inc.を介してPromega Biotechから購入した。逆転写酵素及びRNase HはPharmaciaから入手した。プロテイナーゼKはBoehringer Mannheim Canadaから入手した。すべての形質転換に大腸菌HB101株 (ATCC33694) を使用した。プラスミドpUC19 (Norranders等、1983) はBethesda

de Research Laboratoriesから購入した。

DNAの単離及び配列決定

50 μ g/mlのアンピシリンを含むYT培地 (Miller, 1972) で大腸菌形質転換媒体を増殖させた。高速沸騰法 (Holmes & Quigley, 1981) によってプラスミドDNAを精製した。すべての構築に使用したDNAフラグメント及びベクターを低融点アガロース電気泳動で分離し、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって溶解アガロースから精製した (Maniatis等、1982)。ジデオキシ法 (Sanger等、1977) の修正方法 (Hattori等、1985) を用いてプラスミドDNA配列決定した。反応開始のために-20ユニバーサルプライマー (New England Biolabs) を使用した。

TCA沈殿

増幅反応のアリコート (5 μ l) 20 μ l の10mM EDTA中で制止し、一定時間おきのすべての標本の収集が終わるまで氷上に維持した。次に制止された標本をガラスフィルターディスクに塗布し、直ちに氷冷5%トリクロロ酢酸 (TCA) - 1%のピロリン酸ナトリウム中に浸し込み、10分間ときどき攪拌した。次に氷冷5%TCAで5分間ずつ2回洗浄し、95%エタノールで更に2回洗浄し、凍結によって乾固した。液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

標本 (1~6 μ l) を4~5 μ l のホルムアミド染料 (90%脱イオンホルムアミド、10mM TrisHCl (pH8.0)、1mM EDTA、キシレンシアノール及びブロモフェノールブルー) と混合し、電圧印加前 (pre-run) の12cm長さの7%変性ポリアクリルアミドゲルに塗布した。ブロモフェノールブルー染料が底部に到達するまでゲルに350ボルトを印加した。いくつかの場合にはオートラジオグラフィーにかけ前にゲルを固定しかつ乾燥した。固定は10%メタノール-7%酢酸中で15分間洗浄して行った。この方法で分離されたRNA産物のプロフィールはオートラジオグラフィーによって室温で可視化した。

実施例1

qq試験系用オリゴヌクレオチドの設計及び合成

EcoR I部位と、T7ファージプロモーターと、T7 RNAポリメラーゼによる転写開始に必要な配列と、19bpのハイブリダイゼーション領域 (ハイブリダイゼーション領域1) とを含むように合成DNA配列を設計した (第2A図)。これらの構成要素のクローニングに関与する47bのアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖 (T7H1.GAC) は第1プライマーとしても機能する。ハイブリダイゼーション領域2はハイブリダイゼーション領域1から53bpを隔てており長さ20bpである。この領域 (H2.GAC) に対して形成されるプライマーは20bのセンスオリゴヌクレオチド鎖の重複でありクローニングには使用されない。ハイブリダイゼーション領域全体を含む配列はエイズの原因物質であるHTLV-IIIゲノムのqq部分の92bpのセグメン

トである。この特定遺伝子セグメントを選択した理由は、プライマーが有効にハイブリダイズすると予想されたこと及び2つのハイブリダイゼーション領域間に間隔が比較的短いことにある。更に、クローニングを容易にするために配列の末端にXba I部位を配置した。qaq試験配列はまた、組換え体のスクリーニングを容易にするSah I部位及びPst I部位を含む。

このフラグメントのクローニングにおいては合計4つのオリゴヌクレオチドを使用した。qaq試験配列及びqaq2試験配列の構築に使用したN1.GAGはアンチセンス鎖を完成させクローニング過程でのみ使用される。また、T7 4.PROはT7プロモーターのセンス鎖成分である。しかしながら、N2.GAGは双方の試験フラグメントの構築に使用され、また増幅サイクルの2つの段階の中間体（第2鋳型）として使用された。完全にクローニングされたqaq試験フラグメントはまた、増幅サイクルの中間体（第3鋳型）を構成し得る。適当なベクター中でクローニングされるとqaq試験DNAはT7 RNAポリメラーゼによって転写され、3つの段階に關与する増幅中間体として有用なRNAフラグメント（第1鋳型）を産生する。更にT7H1.GAG及びH2.GAGは試験系のプライマーとしても機能する。

qaq2試験合成DNAフラグメント（第2B図）はT7プロモーターを含まないが配列の残りの部分はqaq試験配列と同じであり、従ってN1.GAG及び2.GAGの双方がその構築に關与した。アンチセンス鎖の完成に必要なオリゴヌクレオチドをH1.GAGと指称する。一旦クローニングされると、qaq2試験フラグメントはDNA制限フラグメントを鋳型核酸として用いながら増幅を試験する鋳型として使用できる。

実施例2

qaq試験プラスミドの構築

70mMのTris HCl (pH7.6) と10mMのMgCl₂ と5mMのDTTと0.5mMのATPと5単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼとを含む20μl反応物中でオリゴヌクレオチドT74.PRO及びN1.GAG（各2μg）を別々に37°Cで30分間リン酸化した。リン酸化したT74.PRO及びN1.GAG（各10μl）を各1μgの非リン酸化T7H1.GAG及びN2.GAGと3μlの100mMのTris HCl (pH7.8) - 500mMのNaClと混合しqaq試験アセンブリ用の最終容量29μlにした。qaq2試験混合物は10μlのリン酸化N1.GAGと各1μgの非リン酸化H1.GAG及びN2.GAGと1.8μlの100mMのTrisHCl (pH7.8) - 500mMのNaClとを最終容量18μlの中に含んでいた。90°Cで10分間維持し10〜16時間でゆっくりと室温まで放冷することによってオリゴヌクレオチド混合物を別々にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを結合するために50mMのTris HCl (pH7.8) と10mMのMgCl₂ と20mMのDTTと1mMのATPと50μg/mlのBSAとを含む60μlの反応物を使用した。qaq試験反応物には400単位のT4 DNAリガーゼを添加し15°Cで2時間インキュベートした。qaq2試験反応物は200単位のT4 DNAリガーゼと共に1

4〜16時間インキュベートした。

ポリリンカー領域内部の制限酵素部位で切断することによって直線化しておいたプラスミドpUC19と単離し精製した合成DNAセグメントとを混合した。T4 DNAリガーゼを使用してqaq試験配列をpUC19のEcoR I-Xba Iフラグメントに結合した。またqaq2試験配列をSma I-Xba Iフラグメントに結合した。これらの反応後に得られた形質転換体由来のプラスミドDNAを使用して大腸菌を形質転換し、制限分析によってスクリーニングし、配列解析によって最終プラスミド（pGAG.TEST及びpGAGL2.TEST）が正しいことを決定した。

実施例3

RNA増幅に対するプライマー濃度の影響

qaq試験オリゴヌクレオチドから転写されたRNAを増幅するために使用された反応混合物（25μl）は50mMのTris HCl (pH8.45) と6mMのMgCl₂ と40mMのKClと10mMのジチオスレイトールと0.5mMのNTP (ATP,CTP,GTP,UTP) と1mMのdNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) と20単位のRNasinと10単位のT7 RNAポリメラーゼと10単位のT7 RNAポリメラーゼト10単位の逆転写酵素と0.4単位のRNase Hと10μCiの[α-32P] UTPとを含有していた。2つの反応物は0.5ng (0.015pmoles) のN2.GAGを含み、一方他の2つの反応物は鋳型を含んでいなかった。プライマーT7H1.GAG及びH2.GAGの各々を最終濃度3.4μMまたは0.3μMでN2.GAG含有または鋳型非含有の反応物に添加した。反応物を42°Cで2時間インキュベートした。30分毎にTCA不溶cpmの取込みを測定することによってRNA総合成量をモニタした。鋳型依存性RNA合成に対するプライマー濃度の影響を表1に示す。等量の合成RNAを含有する各反応のアリコートを手PAGE及びオートラジオグラフィーによって分析した（第3図、反応と同じ番号レーン1〜4）。

表 1
N2.GAGからの2時間後のRNA増幅

反応	各プライマー濃度(μM)	鋳型 (ng)	合成RNA(μg)
1	3.4	0.5	2.8
2	3.4	—	2.1
3	0.34	0.5	1.8
4	0.34	—	0.7

反応1は最大量の同位体取込みを示したが、対照鋳型である反応2も高い取込み率（反応1の73%）を示し、極めて類似した電気泳動プロファイルを示した。従って、高濃度プライマー存在中の増幅においては鋳型が全く存在しなくても、予想されたサイズと等しいサイズのRNA転写物が産生される。1/10のプライマー濃度の標本を使用して得られた結果は顕著な違いを示した。反応3で産生されたRNAの量は反応4の2.6倍であるが、反応3においては質的に全部の転写物が予想されたサイズの単一バンド中に検出され、反応4においては60〜70bを上回るフラグメントは検出されなかった。従ってプライマー

濃度はRNA増幅の正確度及び効率に重要な役割を果たす。

増幅系による産生が予想されるフラグメントのサイズを示すために試験プラスミドからの転写によって対照RNA転写物を調製した(第3図のレーン0)。pGAG.TESTをXba Iで切断して直線化し、プロテイナーゼKで処理し(Maniatis等、1982)、フェノール抽出し、エタノール沈殿した。次にT7 RNAポリメラーゼを製造業者の使用説明書通りに使用し、0.5μgの得られたフラグメントを10μCi [α-32P] UTPを含有する25μlの反応混合物中で転写した。

実施例4

RNA増幅に対する鋳型濃度の影響

gag試験オリゴヌクレオチドから転写されたRNAを増幅するために使用された50μlの標準反応混合物は、0.34μMのT7H1.GAGと0.34μMのH2.GAGと50μMのTris HCl (pH8.45)と6mMのMgCl₂と40mMのKClと10mMのDTTと0.5mMのNTPと1mMのdNTPと40単位のRNasinと20単位のT7 RNAポリメラーゼと20単位の逆転写酵素と0.8単位のRNase Hと10~20μCi [α-32P] UTPとを含有し、1ngから1fgの範囲の種々の量の鋳型(N2.GAG)を含有し、1つの反応は鋳型を含有しない。反応を42°Cで3時間インキュベートし、インキュベーションの開始から30分毎にTCA不溶c

pmの取込みを測定することによってRNA総合成量モニタした。表IIに示すように、RNA総合成量は鋳型のすべての被検濃度において鋳型非含有の対照より多い。RNA総合成量は鋳型濃度の低下に伴って減少する。の減少は定量的ではない。出発鋳型当たりのRNAの増幅度は一般に、鋳型濃度が低いほど大きい。1fgのN2.GAG鋳型から0.8μgのRNAが合成されると8×10⁸倍の増幅度が得られたことになる。1fgの102-b N2.GAGオリゴヌクレオチドは約2×10⁴分子を示す。

表II

N2.GAGからの3時間後のRNA増幅			
反応	鋳型	合成RNA (μg)	増幅倍率
1	1ng	3.5	3.5×10 ³
2	100pg	4.4	4.4×10 ⁴
3	10pg	4.1	4.1×10 ⁵
4	1pg	3.0	3.0×10 ⁶
5	100fg	2.7	2.7×10 ⁷
6	10fg	1.9	1.9×10 ⁸
7	1fg	0.78	7.8×10 ⁸
8	—	0.046	—

反応3時間後に合成されたRNAを各鋳型濃度毎にPAGEで分析した(第4図、反応と同じ番号のレーン1~8)。約100bのRNAを示す主要バンドが鋳型1fg含有及び鋳型非含有の反応を除く全ての反応に存在していた。1fgの鋳型を含有する反応では3時間に100bの産生物を多量に含んでいなかったが、RNA総合成量は鋳型非含有反応より多く定性的な違いを示した。

実施例5

RNA産物のハイブリダイゼーション分析

実施例4の手順の放射性標識UTPだけを削除して1pg~0.1fgの範囲の種々の量のN2.GAG鋳型を含有する増幅反応を行なった。反応を42°Cで3時間インキュベートした。30分毎に各反応からアリコートを取り出しナイロン膜(Amersham)に塗布した。これらの反応アリコートに含まれていた核酸を紫外線照射によって固定した。最終濃度50%v/vのホルムアミドと5×SSCと5×Denhardt溶液(Mania-tis等1982;Southern等、1975)とから成り100cm²当たり5mlに等しい量のプレハイブリダイゼーション緩衝液中で膜を50°Cで1時間プレハイブリダイズし、さらに比活性10⁸cpm/mlの放射性標識プローブのハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイズした。50%のホルムアミド、5×SSC及び5×Denhardt溶液(Mania-tis等、1982;Southern等、1975)中でハイブリダイゼーションを50°Cで16時間行なった。放射性標識プローブは、T4ポリヌクレオチドキナーゼと(α-32P) ATPとを用いて5'末端を標識した合成オリゴヌクレオチド5' GATCTGGGATAGAGTACATCCA3'であった。次に、2×SSCと0.1%v/v SDS及び0.2×SSCと0.1%v/v SDSから成る洗浄液を用い(Southern等、1975;Maniasis等、1982;Szostak等、1979)、50°Cで最低2、3回以上は連続して膜を洗浄した。

第5図は異なるインキュベーション時間で採取された種々の量のN2.GAG鋳型を含有する増幅反応で行ったりハイブリダイゼーション分析の結果を示す。

第5図の縦の列の各々は異なる時点を示し(1は30分、2は60分、3は90分、4は120分、5は150分、6は180分)、横の行の各々N2.GAG鋳型の種々の添加量を示す(1は1pg、2は100fg、3は10fg、4は1fg、5は0.1fg、6は鋳型非添加)。行1~3(1pg~10fg)において標識プローブにハイブリダイズした核酸の増幅が観察されたが、行4及び5(1fg及び0.1fg)においては特定核酸に対するハイブリダイゼーション行6(鋳型非含有)より盛んではなかった。行6の標識プローブの見掛けの非特異的結合はDNAまたはRNA合成と関連すると推定される。その理由はハイブリダイゼーションシグナルが経時的に増加するからである。

実施例6

鋳型としてのDNA制限フラグメントの使用

プラスミドpGAG2.TESTをMsp Iで切断し、プロテイナーゼKで処理し、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって精製し、5分間沸騰させて変性した。N2.GAGオリゴヌクレオチドの代わりにMsp I分解したpGAG2.TESTを鋳型として使用する以外は実施例4と同じ手順で増幅反応を行い分析した。各反応に対するプラスミドの添加量は55ng~5.5pgの範囲であり、1つの反応には鋳型を添加しなかった。実際の標本中に存在するはずの付加的DNAをシミュレートするために、同様に切断し精製し変性

した1ngの子ウシ胸腺DNAを含む別の反応も用意した。42°Cで3時間インキュベーション後にTCA沈殿及びPAGE分析によってRNA合成を測定した。表IIIに示すように、鋳型のすべての試験濃度でRNA総合成量は鋳型非含有対照よりも多かった。実際の鋳型からRNA合成が総プラスミドDNAの1.8%に相当することに基づいて増幅度を計算した。

特定の初期鋳型濃度レベルからのRNA総合成量（増幅度）は、合成オリゴヌクレオチド鋳型（表II）に比較して制限フラグメント（表III）が常に低い値を示した。この理由は、使用条件下において制限フラグメントの相補鎖との競合が生じるためであろう。

表 III
Msp I 一分解pGAG2. TESTから
のRNA増幅

反応	鋳型*	合成RNA**	増幅倍率**
1	55.0ng[1ng]	3.65	3.7×10^3
2		(4.05)	(4.1×10^3)
3	5.5ng[100pg]	3.54	3.5×10^4
4		(3.16)	(3.2×10^4)
5	550.0pg[10pg]	2.29	2.3×10^5
6		(2.79)	(2.8×10^5)
7	55.0ng[1pg]	2.62	2.6×10^6
8		(0.67)	(0.7×10^6)
9	5.5pg[100fg]	1.37	1.4×10^7
10		(2.26)	(2.3×10^7)
11		1.25	
12		(0.08)	

* カギ括弧内の数値はN2. GAG均等量を示す。

** 括弧内の数値は1μgのMsp I 一分解子ウシ胸腺DNAの存在下のRNA合成を示す。

3時間反応後に合成されたRNAをPAGEで分析した（第6図、反応と同じ番号のレーン1～6、11及び12）。反応（レーン）1～6には約100bのRNAを示す主要バンドが存在していたが鋳型非含有反応（レーン11及び12）には該バンドが存在していなかった。レーン0のRNAは実施例3の手順で調製した標準RNAである。1μgのMsp I 一分解子ウシ胸腺DNAを添加した合成RNA（レーン2、4及び6）または非添加合成RNA（レーン1、3及び5）との間に見掛けの定性的差異はなかった。

実施例7

鋳型としてのRNAフラグメントの使用

プラスミドpGAG.TESTをXba Iで切断し、プロテイナーゼKで処理し、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって精製した。T7 RNAポリメラーゼを用いて直線化したpGAG.TESTプラスミドからN2.GAGに相補的な配列のRNAを転写した。得られたRNAをDNase（Pro Mega BioTec）で

分解し、フェノール抽出及びエタノール沈殿によって精製した。実施例5の手順に従って精製RNAを増幅反応の鋳型として使用した。夫々の反応には55ng～5.5pgの範囲の種々の量のRNAを添加した1つの反応には鋳型を添加しなかった。42°Cで3時間インキュベーション後、実施例5の手順に従って標識オリゴヌクレオチドプローブに対するハイブリダイゼーションによって特定RNAの合成を判定した。

実施例8

10 鋳型としてのリボソームRNAの使用 内部配列の増幅

大腸菌16SリボソームRNA（rRNA）の一部に相補的なRNA配列を増幅するために2つのプライマーを使用した。一方のプライマーT7H1RIB3.PR2（AATTCTAATACGACTCACTAGCGGAGTATTACCGCGGCTGCTG）は、T7プロモーターのアンチセンス鎖と開始部位と16S rRNAに相補的な配列とを含む。他方のプライマーRIBB.PR（AATACCTTTCCTCATTGACG）はプライマーとしてT7H1RIB3.PR2を使用し鋳型として16S rRNAを使用して合成されたDNAに相補的である。20 増幅の検出に使用できる第3の合成オリゴヌクレオチドRIB5.PR（AGAAGCACCGGCTAAC）は増幅反応のRNA産物に相補的である。該RNA産物は出発rRNA鋳型に相補的である。

反応混合物（25μl）は、50mMのTris HCl（pH8.45）と6mMのMgCl₂と40mMのKClと10mMのDTTと0.5mMのNTPと1mMのdNTPと20単位のRNasinと10単位のT7 RNAポリメラーゼと10単位のAMV逆転写酵素と0.4単位のRNase Hと0.34μMのT7H1RIB3.PR2と0.34μMのRIBB.PRとを含有する。

50ng～50fgの範囲の種々の量のrRNAを反応物に添加する。1つの反応にはrRNAを添加しない。反応物を42°Cで3時間インキュベートし、インキュベーション開始の30分、60分、120分及び180分後にアリコート採取する。アリコートの反応を制止し、ナイロン膜に固定し、実施例5の手順で³²Pで5'末端を標識したRIB5.PRプローブにハイブリダイズする。

実施例9

鋳型としてのリボソームRNAの使用

5'末端配列の増幅

2つのプライマーを使用して大腸菌16S rRNAの一部に相補的なRNA配列を増幅する。一方のプライマーRIB12.PR（TTACTCACCCGTCGCC）は16S rRNAに相補的である。他方のプライマーT7H1RIB5.PR（AATTCTAATACGACTCACTATATAGGGAGAAATGAAGAGTTTGATCAT）は、プライマーとしてRIB12.PRを使用し鋳型として16S rRNAを使用して合成されたDNAの3'末端に相補的である。増幅の検出に使用できる第3の合成オリゴヌクレオチドRIB11.PR（GTTCGACTTCATGTGTTAGCCCTGCCCGCAGCGTTCAATCTGAGCC）は増幅RNA産物及び出発rRNA鋳型の双方に相補的である。（T7H1RIB3.PR2及びRIBB.PRの代わりに）T7H1RIB5.PR及びRIB12.PRをプライマーとして使用し、（RIB5.PRの代わりに）RI

23

B11.PRをオリゴヌクレオチドプローブとして使用する以外は実施例8と同様にしてrRNAの増幅反応と合成RNAの検出とを行なう。

上記では本発明を好適実施態様に基づいて詳細に説明したが、本発明の要旨及び特許請求の範囲に包含される多様な変更が可能であることは当業者に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

第1図は核酸増幅方法の全体図である。

第2図は増幅方法の試験に使用される合成オリゴヌクレ*10

24

*オチドDNA配列を示し、第2A図はqac試験配列、第2B図はqac2試験配列を示す。

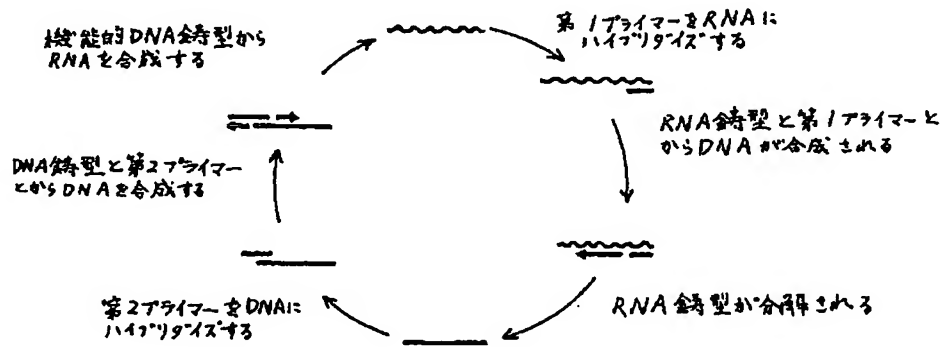
第3図は種々のプライマー濃度を使用した増幅反応のPAGE分析のオートラジオグラムのX線写真を示す。

第4図は種々の鋳型濃度を使用した増幅反応のPAGE分析のオートラジオグラムのX線写真を示す。

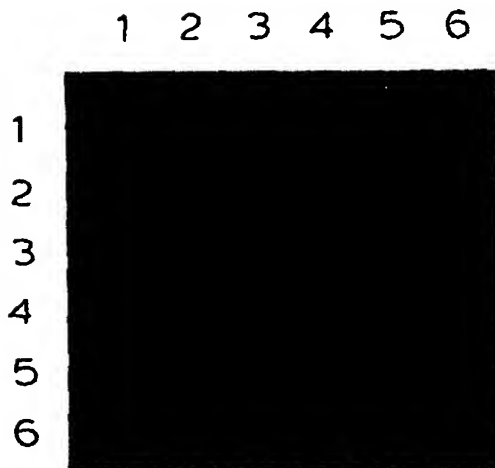
第5図は増幅反応に対するドット・プロットハイブリダイゼーションのオートラジオグラムのX線写真を示す。

第6図は制限フラグメントを鋳型として使用した増幅反応のPAGE分析のオートラジオグラムのX線写真を示す。

【第1図】



【第5図】



【第2図】

A

T7H1.GAG
 AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACAATAGGCCCTGCATGCAC¹TGGATGTACTCTATCCCAT

 GATTATGCTGAGTGATA¹CCCTCTGTATCCGGGACGTACGTGACCTACATGAGATAGGGTA
 T74.PRO

 N1.GAG
 TCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTCTTTTAACATTGTCATGGCTGCTTGATGT

 AGACGTCGAAGGAGTAAC TAC CAGAGAAAAT TGAACG TACC GACGAACTACAGATC
 N2.GAG
 (H2.GAG)
 124

B

H1.GAG
 GGGAGACAATAGGCCCTGCATGCAC¹TGGATGTACTCTATCCCAT

 CCTCTGTATCCGGGACGTACGTGACCTACATGAGATAGGGTA

 N1.GAG
 TCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTCTTTTAACATTGTCATGGCTGCTTGATGT

 AGACGTCGAAGGAGTAAC TAC CAGAGAAAAT TGAACG TACC GACGAACTACAGATC
 N2.GAG
 (H2.GAG)
 124

(14)

特許2650159

【第3図】

0 1 2 3 4



【第4図】

1 2 3 4 5 6 7 8



(15)

特許2650159

【第6図】

0 1 2 3 4 5 6 11 12

